トリプルアクシスディテクタを用いた環境半揮発性物質分析におけるフェムトグラムレベルのGC/MSD検出下限

アプリケーション

環境

著者

Mike Szelewski
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

要旨

きわめて低濃度の半揮発性物質の分析には、分析対象成分の活性、バックグラウンド汚染、装置の感度などによるさまざまな困難が伴います。メソッド要件は世界各国でさまざまですが、最低でも1-µL注入とフルスキャンデータ採取が求められています。MSDをSIMモードで稼動させ、温度プログラム気化（PTV）注入口、微量イオン検出（TID）、トリプルアクシスディテクタ（TAD）を用いれば、最小レベルの検出下限を実現できます。

はじめに

低濃度の半揮発性物質分析は、飲料水や原水に含まれる酸性物質、塩基性物質、中性物質、農薬の混合物を同時に測定する際に用いられます。多くのラボで100種類を超える化合物を分析しており、1分析あたり25分から40分の測定時間がかかっています。サンプルの抽出には、C_{18}ディスクまたはカートリッジによる液固抽出（LSE）が用いられます。ジクロロメタンなどの溶媒による液液抽出も既存の手法として使われることがあります。通常、抽出物の測定には、USEPA Method 525.2[1]などの一般的なメソッドで定義されているように、フルスキャンモードの1 µLのホットスプリットレス注入が用いられます。

多くのラボで改善が求められているのが、分析の感度です。感度は、サンプルの前処理や注入量、装置のチューニング、メソッド、および全体的なシステム動作に左右されます。また、「感度」というのは混乱を招く用語でもあります。最大感度、最小感度、最高感度、最小検出下限、装置検出下限（IDL）、メソッド検出下限などの言葉が「感度」の意味で用いられています。

これまでに、直線性、スピード、生産性、大量注入などに注目した文献[2–5]が発表されています。感度はそのすべてに関連する要素ですが、多くの場合は他と両立し難い要素でもあります。

本アプリケーションでは、IDLに影響を及ぼすパラメータ、すなわちGC/MSDシステムの「感度」に注目しています。IDLを算出する統計的手法も存在しますが、そうした手法では「実際に目で見て検出できる濃度は？」や「積分できるピークを生成するための最低濃度は？」といった疑問に答えることはできません。

分析条件

推奨する分析条件を表1に記載しています。これらのパラメータはデフォルト条件ですので、最適化が必要となる場合があります。最高の感度を得るためには、分析対象成分の最大量をカラムへ移送できるようにパラメータを選択する必要があります。さらに、活性のある分析対象成分は影響を受けやすいため、よい感度を得るためにはシステム全体を不活性にする必要があります。

分析者の多くは、PTVの使用方法として、溶媒ベントモードの大量注入（LVI）のみ使用しています[4]。LVIでは低濃度レベ

表1. ガスクロマトグラフおよび質量分析条件

GC	Agilent 7890A または 6890N		
注入口	EPC PTV		
モード	スプリットレス		
オーブン	°C/min	Next°C	ホールド時間
初期		20	0.05
ランプ1	600	350	0.90
ランプ2	10	250	0.00
クライオ	オン		
クライオ使用開始温度	100 °C		
クライオタイムアウト	10.00分（オン）		
クライオフォルト	オン		
圧力	11.40 psi（オン）		
パージ流量	30.0 mL/min		
パージ時間	1.50分		
総流量	34.4 mL/min		
ガス・セーバ	オフ		
ガスタイプ	ヘリウム		
PTVライナ	Agilentマルチバッファライナ、パッキングなし、部品番号 5183-2037		
PTV注入口	120V		
PTV温度プログラミング	°C/min	Next °C	ホールド時間
初期		40	2.50
ランプ1	50	110	0.00
ランプ2	10	320	1.10
総分析時間	26分		
平衡時間	0.5分		
オーブン最高温度	325 °C		
カラム	Agilent HP 5 Msi、部品番号 19091S-433i		
長さ	30.0 m		
直径	0.25 mm		
膜厚	0.25 µm		
モード	定流量		
圧力	11.40 psi		
名目初期流量	1.4 mL/min		
注入口	フロント		
出口	MSD		
出口圧力	真空		
RTL	システムのリテンションタイムをフェナントレン-d10の12.700分でロック		

フロントインジェクタ	
サンプル洗浄	1
サンプルポンプ	2
注入量	2.0 µL
シリンジサイズ	10 µL
プレ注入溶媒A洗浄	0
プレ注入溶媒B洗浄	1
ポスト注入溶媒A洗浄	3
ポスト注入溶媒B洗浄	2
粘度ディレイ	0秒
プランジャスピード	高速
プレ注入ドゥエル	0分
ポスト注入ドゥエル	0分
MSD	Agilent 5975C、トリプルアクシスディテクタ
ドローアウトレンズ	3 mm標準開口ドローアウトレンズ
溶媒ディレイ	4分
低質量	45 amu
高質量	450 amu
スレッシュホールド	0
サンプリング	2
四重極温度	180 °C
イオン源温度	300 °C
トランスファライン温度	280 °C
チューンタイプ	オートチューン
EMVモード	ゲイン係数 = 1
MSD-SIM	
AutoSIM使用	イオン選択、グループ、切り替え時間択
グループ数	25
化合物/グループ	1～22
イオン/グループ	2～45
ドゥエルタイム、msec	5～50
サイクル/ピーク	最小10

キャリブレーション標準

Ultra Scientific、部品番号 DWK-5252。4種類の混合物による、計108種類の化合物
次の7種類の濃度レベル：10、4、1、0.4、0.1、0.04、0.01 ppm
各サンプルに3種類の内部標準（IS）2 ppmおよび4種類のサロゲート標準（SS）2 ppmを添加。その後、各サンプルをジクロロメタンに1:100で希釈し、次の7つの濃度レベルを作成：100、40、10、4、1、0.4、0.1 ppb (pg/uL)（IS/SSは2 ppb）

ルの検出が可能になりますが、溶媒を排出する際に一緒に排出される化合物があるため、よい回収率を得るためにメソッドを最適化しなければなりません。また、LVIでは大量のマトリックスが注入されるため、シグナル/ノイズ比（S/N）が改善しない場合もあります。PTVには他の分析モードにあります。本アプリケーションでは「コールド」スプリットレスモードを使用しました。通常のホットスプリットレス注入口ではなく、コールド注入口でスプリットレス注入をおこなうことには、次のような利点があります：

1. 溶媒の膨張を最小限に抑えられる；分析対象成分がライナの外側に出たり、金属表面と接触したりしないため、分解を最小限に抑えられる。
2. きわめて低い温度で分析対象成分が気化するので、分解を最小限に抑えられる。
3. 揮発性溶媒を最初にカラムへ移動できる；2～5 µLの注入における分析対象成分のピーク形状が向上する。

図1には、PTV温度および流量プログラム、オーブンプログラムを示しています。高速注入の間（0.05分）は、溶媒であるジクロロメタンの沸点（39.8℃）よりも低い20℃にPTVを保ちます。注入が終了したら、PTVを350℃まで急速に加熱し、分析対象成分をカラムに移動させます。スプリットレス時間（1.5分）が終了したら、注入口を30 mL/minでパージします。分析中、PTVの温度を下げます。

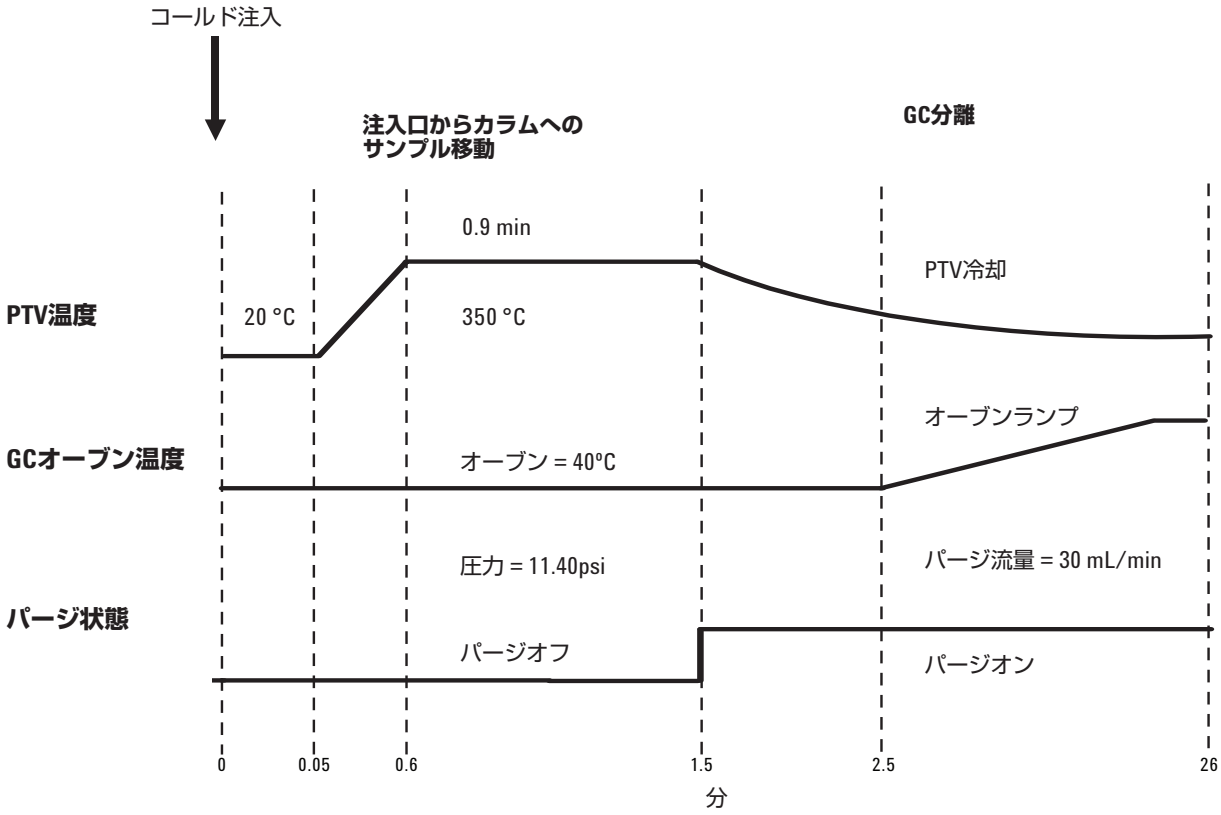

図1. PTVコールドスプリットレスの温度および流量プログラム

PTVプログラムは複数のランプを設定することができます。PTV注入口ライナ（部品番号 5183-2037）は不活性処理されたマルチバッフル型を使用しています。活性のある化合物の分解を引き起こす可能性のあるグラスウールは用いていません。このライナは、高速注入で2～5 µL注入に対応できるだけのキャパシティを備えています。本アプリケーションでは、2 µL注入を採用しました。

オーブンプログラムとPTVパラメータの関係を図1に示しています。オーブンの初期温度は40℃で、注入後、分析対象物のカラムへのスプリットレス移動の間は、初期温度を保持します。その後、オーブンは110℃まで急速に加熱後、化合物を分離するためにゆっくりした昇温にします。オーブンを40℃で保持する時間は1.5分から2.5分で、通常より1分ほど長くしてあります。これにより、分析対象成分のリテンションタイムロッキング（RTL）が可能です。また、必要な場合には注入をLVIにスケールアップすることもできます。240VのPTVを使用しましたが、120VのPTVでも表1に記載のランプ速度が可能です。

HP-5MSiカラムは不活性で、本メソッドに適しています。このカラムは、環境分析ラボでもっとも広く使用されているHP-5MSカラムシリーズの最新バージョンです。ピーク形状と感度を維持するために、1.4 mL/minの定流量モードで分析しました。

本システムでは、フェナントレン-d10の12.700分でリテンションタイムをロックしました。ロックするおもな利点は、SIMグループの切り替え時間を一定に保てるという点です。カラムのカット後は、ロックした標準を再分析するだけで、シフトしたピーク時間を再現できます。定量データベースや積分イベントを変更する必要はありません。RTLの数々の利点を説明したRTLアプリケーションについては、www.agilent.com/chemで紹介しています。RTLを使わずに、これほど多くのSIMグループを扱うメソッドを生産性の高いラボで実行するのは、ほとんど不可能です。

最高の感度を得るために、標準的な3 mmドローアウトレンズを使用しました。過去の研究では、オプションの6 mmレンズを使用すると、広い検量線範囲で直線性が向上することが示されています[1]。ただし、6 mmレンズを使用すると、通常はIDLが2～5倍ほど低下します。

装置にはトリプルアクシスディテクタ（TAD）を搭載する5975C MSDを使用しました[6]。TADにはいくつかの利点があります。そのうちの1つが、「シグナルが向上する一方で、オフアクシス設計によりニュートラルノイズを大幅に低減できる」という点です。標準サンプルでは化学ノイズが少ないため、S/Nがさらに向上し、より低いIDLが実現します。データ採取の際には、微量イオン検出（TID）をオンにしました[7]。TIDはノイズを最小限に抑えるためのフィルタリング機能で、ソフトウェア内で選択することができます。

データはスキャンモードかSIMモードのいずれかで採取し、SIM/Scan同時データ取り込みモードは使用しませんでした。サンプリングレートは2を採用しました。これは、通常内径250 µmのカラムを用いているメソッドと同様です。このサンプリングレートとマスレンジを45～450に設定することにより、各ピークのスキャン回数は10回以上となります。

AutoSIM設定とスキャン定量データベースを併用して、イオン選択、グループ、切り替え時間を設定しました。AutoSIMのSIM測定テーブルをそのまま使用し、ピーク形状が悪いことで知られているテブチウロン（イオン156）とトリシクラゾール（イオン189）のみ、ピークが溶出するグループに手動で追加しました。すべての内部標準（ISTD）およびサロゲート標準（SS）について、ターゲットイオンと1つのクォリファイアイオンを使用しました。その他の分析対象成分については、スペクトル内に十分な量で存在する場合には、ターゲットイオンと2つのクォリファイアイオンを使用しました。各ピークで最低10個のデータポイントを採取しました。

イオン源温度は、一般的に用いられる230～250℃ではなく、300℃としました。こうした高い温度を用いると、ピークテーリングが最小限に抑えられ、PAHの感度が向上します[5]。

USEPA 525から化合物リストを入手しました。このリストには、世界中のラボが低濃度レベルまで分析している一般的な分析対象成分が記載されています。USEPA 8270リストについては、高濃度のマトリックスを含む廃棄物サンプル中の化合物濃度を対象にしており、本研究の目的には見合わないことから、使用しませんでした。固体および廃棄物サンプルの感度を高める最良の方法は、抽出物のクリーンアップです。市販の混合物質に含まれないジスルホトンスルホキシドとジスルホトンスルホンを除く単一成分の分析対象物については、ジクロロメタンで標準サンプルを調製しました。多成分のトキサフェンとアルクロール類については、標準サンプルを作成しませんでした。

USEPA 525で定められた低濃度半揮発性物質の一般的な検量線範囲は、0.1～10 ppmです。まず、2 ppmのISTDとSSを含む0.01～10 ppmの標準サンプルを作成しました。さらに分析濃度を低くするために、各サンプルを1:100で希釈し、濃度0.1～100 ppbとしました（ISTDおよびSSは20 ppb）。アトラジンとアラクロールは2つの混合原液中に存在するため、濃度は他の分析対象成分の2倍になります。ペンタクルルフェノールの濃度は、USEPA 525に記載されているように、他の分析対象成分の4倍です。

結果

0.1～100 ppbの標準溶液をSIMモードとスキャンモードで分析しました。0.1 ppbのスキャンモード注入によるデータでは、十分なレスポンスが得られませんでした。または、ノイズが大きすぎて再現可能な方法では分析できませんでした。0.1 ppbのSIMデータでは、スキャンデータに比べてデータ品質が大幅に向上し、一般のメソッドとして使用することが可能でした。1.0 ppb（2 pg）の各分析対象物をスキャンモードで分析した場合のS/Nと、0.1 ppb（0.2 pg）および1.0 ppbをSIMで分析した場合のS/Nを表2に示しています。各値は、同一のシステムで3回にわたって採取したデータを、振幅値ノイズにより平均したものです。

表2. 各分析対象成分のシグナル/ノイズ比（SIMモードおよびスキャンモード）

		pg →	0.2 SIM	2.0 SIM	2.0 スキャン
化合物	イオン	RT	S/N	S/N	S/N
ヘキサクロロシクロペンタジエン	237	7.960	6.3	77	7.5
トリフルラリン	264	11.608	4.4	49	7.7
シマジン	201	12.274	1.0	16	2.4
アトラジン	200	12.385	3.1	30	13
ペンタクロロフェノール	266	12.492	2.4	20	3.7
クロロタロニル	266	13.146	2.6	26	2.9
アルドリン	66	14.661	1.6	15	1.9
ヘプタクロルエポキシド	353	15.429	6.2	49	3.4
4,4′-DDE	246	16.557	7.0	72	17
カルボキシン	143	16.696	2.4	22	4.0
エンドリン	263	17.003	2.3	22	4.1
4,4′-DDD	235	17.323	7.5	76	7.5
4,4′-DDT	235	18.000	5.9	60	5.9

ほとんどの化合物で、2種類の濃度におけるSIMのS/Nの関係が良好です。このことは、レスポンスが正確で、システム全体が不活性であることを示しています。低濃度（0.2 pg）では、シマジンでわずかに感度Nが低下し、ペンタクロロフェノールとヘプタクロルエポキシドでは若干の吸着が見られます。200フェムトグラムレベルの分析では、こうした結果はよくみられることです。

2.0 pgにおけるスキャンモードのS/Nは、SIMよりも3倍から15倍ほど低くなっています。スキャンモードからSIMモードへの移行によるS/Nの向上は、オリジナルのサンプリングレートに対するドゥエルタイムに関連しています。

SIMおよびスキャンモードにおける1.0 ppbレベルの抽出イオンクロマトグラム（EIC）を図2a～2dに示しています。SIMおよびスキャンシグナルのいずれについても、定量に使用できるS/Nが得られていることがはっきりと分かります。特に目を引くのは、8 pgのフルスキャンでもペンタクロロフェノールのレスポンスとピーク形状がきわめて良好だという点です。

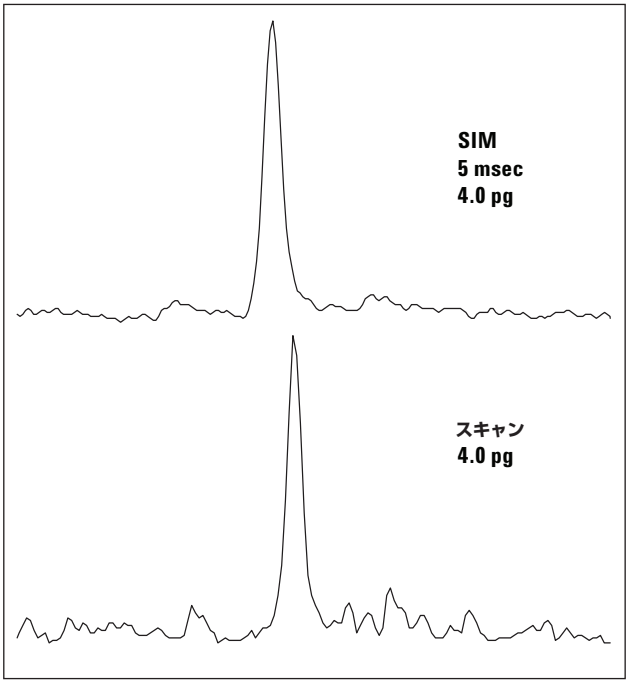

図2a.　アトラジン – 抽出イオン200、RT 12.350分

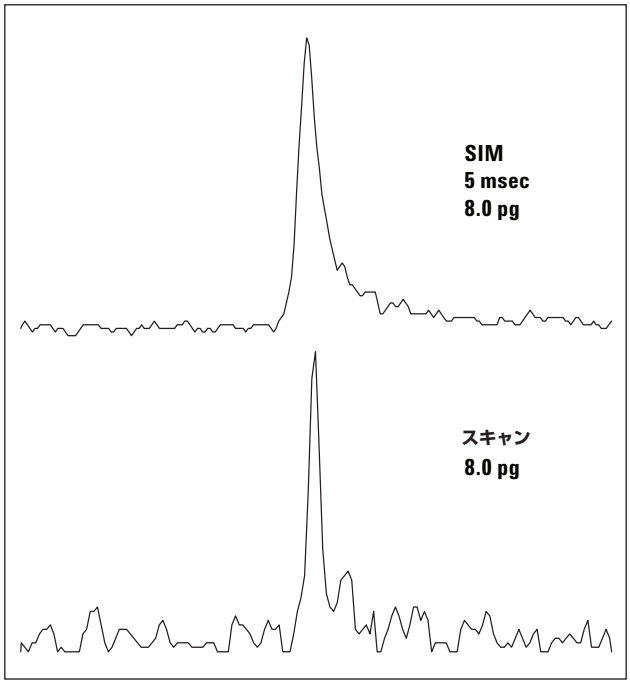

図2b.　ペンタクロロフェノール – 抽出イオン266、RT 12.445分

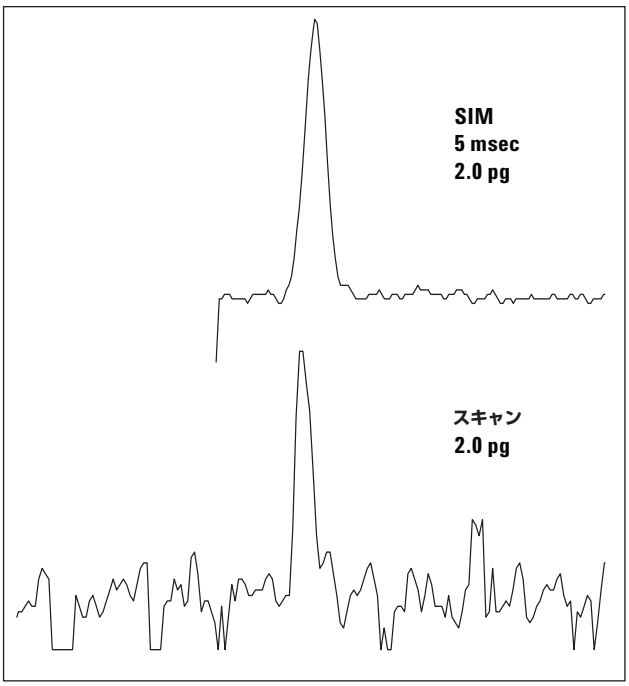

図2c.　アルドリン – 抽出イオン66、RT 14.616分

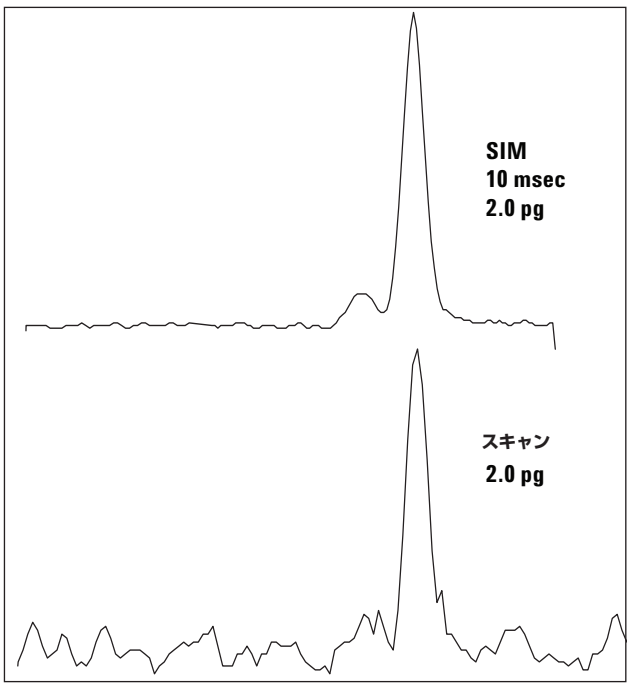

図2d.　4,4'-DDT – 抽出イオン235、RT 18.00分

本アプリケーションでは直線性には注目していませんが、直線性は不活性、再現性、感度の指標になります。直線性を決定するのは、検量線範囲における各化合物の相対感度係数（RRF）の%相対標準偏差（%RSD）です。

GC/MSD ChemStationとExcelを組み合わせれば、%RSDとRRFを自動的に算出できます。%RSDはメソッドにより左右されるので、絶対的な値はありません。各化合物のRRFの%RSDを表3に示しています。

表3.　各分析対象成分の直線性

検量線範囲（pg →） 化合物	0.2–200 SIM %RSD	2–200 スキャン %RSD
ジクロルボス	1.9	7.0
メビンホス	10.1	7.0
2,3-ジクロロビフェニル	5.3	3.0
アトラジン	14.2	14.5
ペンタクロロフェノール	6.3	33.0
アントラセン	2.2	3.0
クロロタロニル	7.6	25.0
ヘプタクロルエポキシド	6.6	13.0
4,4′-DDE	4.5	9.0
4,4′-DDD	7.4	8.0
4,4′-DDT	4.0	5.9

ペンタクロロフェノール（PCP）やクロロタロニルといった一部の%RSDの値は若干高いように見えます。しかし、これらの値は、USEPA 525の基準よりも50倍も低い2～200 pgレベルのスキャンモード分析により得られたものです。SIMのデータは、基準よりも500倍低く、範囲が10倍も広い0.2～200 pgレベルの分析により得られています。したがって、このデータはフェムトグラムレベルにおける不活性と検出能を示しているといえます。

全体的なシステムにおける直線性の補足的な評価として、すべての%RSDの平均値を算出したところ、SIMデータでは8%、スキャンデータでは13%でした。一部の化合物については、確実に測定できるようなシグナルが得られなかったため、すべての化合物を0.1 ppbレベルでキャリブレートしたわけではありません。低濃度でも容易に検出できるフタル酸エステル類については、一般的なラボ汚染物質であることを考慮し、平均値の計算から除外しました。

200フェムトグラムレベルの化合物6種類のSIM分析により得られたEICを図3に示しています。すべての化合物がノイズから良好に分離し、検出されています。研究者の感度の尺度として、文書の冒頭で「実際に目で見て検出できる濃度は？」という質問をあげました。その答えは、スキャンモードの場合、「ほとんどの環境半揮発性物質で、きわめて低いピコグラムレベルまで検出可能」というものです。SIMモードのIDLはさらに低く、フェムトグラムレベルの検出が可能です。

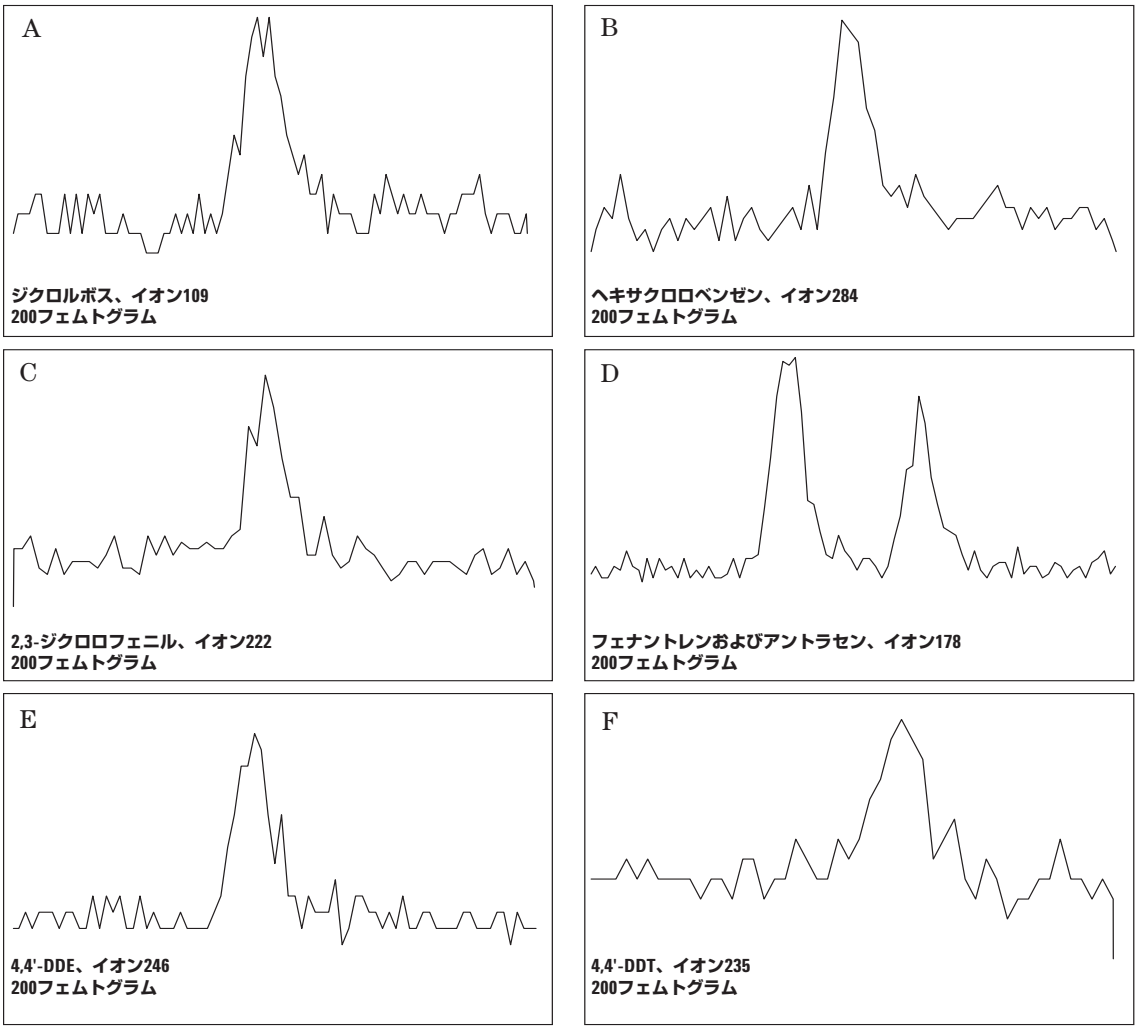

図3.　200フェムトグラムレベルのEIC

結論

従来の半揮発性物質分析メソッドを改良すれば、より優れた装置検出下限を実現できます。トリプルアクシスディテクタ（TAD）などのハードウェアにおける技術の進歩により、装置の感度が向上しています。また、微量イオン検出（TID）を用いたシグナル処理により、ノイズが低減し、S/Nが向上します。さらに、「コールド」スプリットレスモードでPTVを使用すれば、カラムへ移動するサンプル量を最大化し、かなり低い温度で分析対象成分を気化させることができます。不活性のカラムやイオン源とPTVを組み合わせれば、感度を簡単に向上させることが可能です。そして、スキャンモードからSIMモードに切り替えれば、S/Nが3～50倍も向上します。こうしたすべてのハードウェアやソフトウェア、操作パラメータを組み合わせれば、フェムトグラムの装置検出下限（IDL）と感度が実現します。

参考文献

1. USEPA Method 525.2 is available from different sources listed on www.epa.gov/OGWDW/methods/where.html.
2. M. Szelewski, B. Wilson, and P. Perkins, “Improvements in the Agilent 6890/5973 GC/MSD System for Use with USEPA Method 8270,” Agilent Technologies, publication 5988-3072EN.
3. M. Szelewski, “Fast Semivolatiles Analysis Using the Agilent Technologies 6890/5973 inert GC/MSD,” Agilent Technologies, publication 5989-0207EN.
4. M. Szelewski, “Part-per-Trillion Calibration of Semivolatiles Using LVI-PTV-GC/MSD,” Agilent Technologies, publication 5989-6589EN.
5. M. Szelewski, “Synchronous SIM/Scan Low-Level PAH Analysis Using the Agilent Technologies 6890/5975 inert GC/MSD,” Agilent Technologies, publication 5989-4184EN.
6. H. Prest and J. Foote, “The Triple-Axis Detector: Attributes and Operating Advice,” Agilent Technologies, publication 5989-7655EN.
7. R. Roushall and H. Prest, “The 5975C Series MSDs: Method Optimization and Trace Ion Detection,” Agilent Technologies, publication 5989-6425EN.

詳細情報

アジレントの製品とサービスの詳細については、
ウェブサイト（www.agilent.com/chem/jp）をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により
付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、仕様等は、予告なく変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
April 14, 2008
5989-8342JAJP

Agilent Technologies